報 文

哺乳動物の肝臓エチルアルコール代謝酵素系におよぼす イノシン投与の影響

一寸木 宗一, 菅 原 龍 幸*, 戸川 美 奈 子
前 川 昭 男, 鈴 木 隆 雄

東京農業大学農芸化学科栄養食品化学研究室

*女子栄養大学食品化学研究室

Ethyl Alcohol Metabolism Liver by in Mammalian Administration of Inosine

Soichi CHOKKI, Tatsuyuki SUGAWARA*, Minako TOGAWA,
Akio MAEKAWA, Takao SUZUKI

*Laboratory of Nutrition and Food Chemistry, Department of Agricultural Chemistry,
Tokyo University of Agriculture*

**Laboratory of Food Chemistry, Women's College of Nutrition*

The authors have reported on the physiological studies of inosinic acid (5'-IMP), inosine (Hx-R) and their related compounds to the rat liver pyruvate dehydrogenase (E.C. 1.2.4.1.), xanthine oxidase (E.C. 1.2.3.2.) and amidophosphoribosyltransferase (E.C. 2.4.2.14.).

Furthermore, new and interesting data on the metabolic roles of nucleic acid compounds in animal tissues have also been presented.

In this work effects of Hx-R on the mammalian liver alcohol dehydrogenase (ADHase) (E.C. 1.1.1.1.) and aldehyde dehydrogenase (ALDHase) (E.C. 1.2.1.3.) were studied.

Enzyme preparation was prepared by R.K. Bonnichsen and Gordon's method using porcine or bovine liver, and other experiments were carried out with liver homogenate of rat, porcine or bovine.

ADHase and ALDHase activity were measured by manometric method. In addition, variation of ADHase activity with regards to administered amounts of Hx-R were conducted by intraperitoneal injection on rat liver, and after the oral administration of a commercially available alcohol drink at the same time intraperitoneal injection of Hx-R were carried out, and alcohol concentration in rat blood were measured.

The additive effects of Hx-R to increase ADHase activity, liver homogenate and enzyme preparation of ADHase were recognized, especially at enzyme preparation. *In vivo* the same results were obtained, but the role of Hx-R to ALDHase activity were not recognized clearly. Alcohol concentration in rats blood gave a low value in Hx-R administered group.

(Received April 17, 1975)

イノシン (Hx-R) および関連化合物の生理活性については、前川^{1)~4)}、藤岡⁵⁾、菅原⁶⁾、一寸木^{7)~8)} らにより種々検討報告されている。

とくに1966年江指⁹⁾ は、白ネズミ肝臓ホモジネートのアルコール酸化能を検討し、Hx-R 添加がアルコール酸化能を増加する現象を認め報告している。

今回は上記現象をさらに追究する目的で、白ネズミ、牛、豚の肝臓を用い *in vitro* において、Hx-R 添加がアルコール脱水素酵素 (ADHase) [E.C. 1.1.1.1.]、アルデヒド脱水素酵素 (ALDHase) [E.C. 1.2.1.3.] 活性に及ぼす影響をおよぼすかについて実験し、ついで白ネズミに Hx-R を腹腔注射した場合の ADHase 活性の時間的変動、投与量と活性度の関連を調べ、さらに白ネズミにアルコールを経口投与後、Hx-R を腹腔注射し血中アルコール濃度の経時的変化を検討した。

実験方法

1. 実験動物

実験には100 g前後のウィスター系雄白ネズミを用い、恒温(22±3°C)恒湿(55±5%)の動物飼育室で Table 1 に示す飼料を水とともに自由飽食させ飼育した。酵素活性測定には断首放血後、摘出した白ネズミ肝臓を使用した。牛および豚肝臓は東京都芝浦屠場で屠殺直後のものを入手、ただちに凍結して実験材料とした。

血中アルコール濃度測定には白ネズミの大腿部動脈を切断、採血を行ない実験に供した。

2. 酵素活性の測定

1) 肝臓ホモジネートを用いた ADHase, ALDHase 活性の測定は、各種動物肝臓一定量に冷 1/5 M リン酸緩衝液(pH 7.4) 5倍量を加え、氷冷下ホモゲナイズし、2500回転、15分間遠沈その上澄を粗酵素液とした。

酵素活性はワールブルグ検圧計を用い、Table 2 に示す反応組成で森村¹⁰⁾の方法に準じて測定した。

2) ADHase の部分精製は、R.K. Bonnichsen¹¹⁾の方法、また ALDHase については Gordon¹²⁾¹³⁾の方法に準じて行ない、いずれも Table 3 に示す反応組成でワールブルグ検圧計を用い酵素活性を測定した。

3) *in vivo* における白ネズミ肝臓アルコール酸化酵素系におよぼす Hx-R 投与の影響を検討する実験ではこれまでの各種酵素活性についての実験結果^{6)~8)}から Hx-R 投与量を 200 mg/rat とした。すなわち、Hx-R を生理的食塩水に溶解、200 mg/rat 腹腔注射し、それぞれ 0, 2.5 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr 経過後、断首放血、肝臓を摘出し、1)の方法に準じて肝臓ホモジネートを調製 ADHase 活性を測定した。

4) Hx-R 投与量の影響を検討する目的で 0, 5 mg,

Table 1. Compositions of diet.

Casein	20%
Wheat starch	64
Soy bean oil	10
(contg. cod-liver oil 4%)	
Salt mixture*	5
Vitamin mixture*	1

* Harper, A.: *J. Nutr.*, 68, 405 (1955).

10 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg/rat をそれぞれ腹腔注射、2.5 hr 経過後、断首放血、肝臓を摘出、1)の方法に準じて肝臓ホモジネートを調製し ADHase 活性を測定した。

3. 血中アルコール濃度の測定

体重 250~300 g のウィスター系雄白ネズミ 24 頭を 2 群に分け、第 1 群 12 頭を対照群としアルコール 43% を含む市販酒精飲料 2 ml/rat をビペットで経口投与、第 2 群 12 頭は Hx-R 投与群とし Hx-R 10 mg/100 g of rat body weight 腹腔注射後、さらに酒精飲料 2 ml/rat を経口投与した。両群ともさらに 4 頭ずつ 3 群に分け酒精飲料投与、2.5 hr, 4.5 hr, 6 hr 経過後、白ネズミ大腿部より採血、血中エタノール濃度をシグマ社製アルコール定量用キットを用いて測定した。

実験結果

1. 動物肝臓アルコール酸化酵素系におよぼす Hx-R 添加の影響

1) *in vitro* の実験で白ネズミ、牛、豚肝臓ホモジネートに Hx-R を添加した場合、それぞれ基質のエタノールを含まない自己呼吸を差し引いた値で、Fig. 1 に示す

Table 2. Reaction system for measurement of ADHase and ALDHase activity using mammalian liver homogenate.

Components	Contents							
	Control A	Control A*	Added B	Hx-R B*	Control C	Control C*	Added D	Hx-R D*
Liver homogenate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1/5 M phosphate buffer (pH 7.4)	1.8	1.5	1.3	1.0	1.8	1.5	1.3	1.0
1/5 M EtOH	—	0.3	—	0.3	—	—	—	—
1/5 M CH ₃ CHO	—	—	—	—	—	0.3	—	0.3
7.4 mM Hx-R	—	—	0.5	0.5	—	—	0.5	0.5
20% KOH	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

A, B: none substrate, A*, B*: 1/5 M EtOH,
C, D: none substrate, C*, D*: 1/5 M CH₃CHO.

Total 3.0 ml

Table 3. Reaction system for measurement of ADHase and ALDHase activity.

Components	Contents							
	Control A	Control A*	Added B	Added Hx-R B*	Control C	Control C*	Added D	Added Hx-R D*
Enzyme preparation	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$1/5$ M phosphate buffer (pH 7.4)	1.0	0.7	0.8	0.5	1.0	0.7	0.8	0.5
$1/5$ M EtOH	—	0.3	—	0.3	—	—	—	—
$1/5$ M CH_3CHO	—	—	—	—	—	0.3	—	0.3
7.4 mM Hx-R	—	—	0.2	0.2	—	—	0.2	0.2
1.5 mM NAD	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
$1/500$ M Methylene blue	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
20% KOH	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

A, B: none substrate, A*, B*: $1/5$ M EtOH,C, D: none substrate, C*, D*: $1/5$ M CH_3CHO ,

A, A*, B, B*: enzyme preparation by R. K. Bonnichsen's method,

C, C*, D, D*: enzyme preparation by Gordon's method.

Total 3.0 ml

Fig. 1. Effects of Hx-R on the activation of ADHase in porcine, rat and bovine liver homogenate.

○ { A: Hx-R } porcine liver homogenate.
 ○ { A': none }
 ● { B: Hx-R } rat liver homogenate.
 ● { B': none }
 △ { C: Hx-R } bovine liver homogenate.
 △ { C': none }

(QO_2 $\mu\text{l}/\text{N}$)

とおり、いずれの動物肝臓ホモジネートについても、アルコールを基質とした場合 Hx-R 添加により酸化能増加が認められた。またアセトアルデヒドを基質とした場

Fig. 2. Effects of Hx-R on the activation of ALDHase in porcine, rat and bovine liver homogenate.

○ { A: Hx-R } bovine liver homogenate.
 ○ { A': none }
 ● { B: Hx-R } porcine liver homogenate.
 ● { B': none }
 △ { C: Hx-R } rat liver homogenate.
 △ { C': none }

合, Fig. 2 に示すごとく Hx-R 添加による影響は認められなかった。

2) 上記現象をさらに確認するために, ADHase については R.K. Bonnichsen の方法, ALDHase については Gordon の方法に準じて酵素を部分的に精製, それ

それぞれの酵素液を用いて Hx-R の影響を追究したが、それぞれエタノールを含まない自己呼吸を差し引いた値で対照区と Hx-R 添加区を比較した場合、Fig. 3 に示すごとく、ADHase 活性は Hx-R 添加で増加することが認められた。しかし ALDHase 活性は Fig. 4 に示すごとく Hx-R 添加による活性増加は認められなかった。

3) *in vitro* において白ネズミ肝臓ホモジネートに Hx-R を添加した場合、アルコール酸化酵素系とくに ADHase 活性の増加が認められたので、*in vivo* においても同様の結果が得られるか否か実験を試みた。Hx-R 200 mg/rat 腹腔注射後、それぞれ 0, 2.5 hr, 4.5 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr 経過後、断首放血、肝臓を摘出して ADHase 活性を測定した。Table 4 に示すように 2.5 hr 経過した白ネズミ肝臓 ADHase 活性は投与直後屠殺したもの に 比較して、 $|t|27.71 > t_{0.01} = 3.707$, 4.5 hr 経

過で $|t|26.16 > t_{0.01} = 3.707$ という数値が得られ、活性増加が有意の差として認められた。なお活性は 4.5 hr 経過で最高となり、以下漸減する傾向が見られた。

4) 白ネズミに対する Hx-R の投与量をそれぞれ 0, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg/rat とし、投与量の相違が酵素活性にいかなる影響をおよぼすかについて検討したところ、Table 5 に示すように Hx-R 5 mg/rat の投与量で無投与群に比較して $|t|3.74 > t_{0.05} = 2.447$, 200 mg/rat の群で $|t|24.08 > t_{0.01} = 3.707$ の数値が得られ、Hx-R 5 mg/rat の投与量で ADHase 活性への影響が認められ、順次投与量を増加しても大幅な活性増加は見られなかったが、無投与に比較して有意の

Fig. 3. Effects of Hx-R on the activation of ADHase in porcine and bovine liver.

○ {A: Hx-R } porcine liver ADHase by R.K.
 ○ {A': none } Bonnicksen's method.
 ● {B: Hx-R } bovine liver ADHase by R.K.
 ● {B': none } Bonnicksen's method.

Fig. 4. Effects of Hx-R on the activation of ALDHase in porcine and bovine liver.

○ {A: Hx-R } porcine liver ALDHase by R.K.
 ○ {A': none } Bonnicksen's method.
 ● {B: Hx-R } bovine liver ALDHase by R.K.
 ● {B': none } Bonnicksen's method.

Table 4. Rat liver ADHase activity by the intraperitoneal injection of Hx-R*.

Treatment	No. of rats	Unit activity**	Specific activity***
None	4	143.90 ± 12.69	4.99 ± 0.42
After 2.5 hr	4	281.26 ± 12.17	8.75 ± 0.39 ^{a)}
4.5 hr	4	257.35 ± 19.55	9.05 ± 0.49 ^{b)}
6.0 hr	4	185.91 ± 13.74	6.16 ± 0.30
12.0 hr	4	206.21 ± 2.36	5.96 ± 0.07
24.0 hr	4	205.54 ± 17.97	6.50 ± 0.37

* Two hundred mg of Hx-R were administered to one rat by the intraperitoneal injection.

** QO₂ μl/hr/liver(g), *** QO₂ μl/hr/N (mg).

^{a)} ^{b)} mean ± standard error, significantly different ($p < 0.01$) from none treatment group.

Table 5. Variation of rat liver ADHase activity by the difference of administered amounts of Hx-R*.

Treatment	No. of rats	Unit activity**	Specific activity***
None	4	132.40 ± 5.13	4.15 ± 0.16
Hx-R 5 mg	4	184.33 ± 27.84	5.40 ± 0.76 ^{a)}
10 mg	4	160.80 ± 13.59	5.30 ± 0.39
50 mg	4	157.96 ± 10.99	4.89 ± 0.45
100 mg	4	192.04 ± 30.31	6.00 ± 0.81
200 mg	4	200.81 ± 27.34	6.47 ± 0.40 ^{b)}

* Rats were killed after a lapse of 2.5 hr from the intraperitoneal injection respectively.

** QO₂ μl/hr/liver(g), *** QO₂ μl/hr/N(mg).

^{a)} mean ± standard error, significantly different ($p < 0.05$) from none treatment group.

^{b)} mean ± standard error, significantly different ($p < 0.01$) from none treatment group.

Table 6. EtOH concentration in rat blood.

Treatment	No. of rats	EtOH mg/100 ml rat blood
After 2.5 hr, Hx-R* + sample**	4	2.84 ± 2.19 ^{a)}
sample	4	5.68 ± 3.24
After 4.5 hr, Hx-R + sample	4	6.45 ± 3.52 ^{b)}
sample	4	18.95 ± 13.77
After 6.0 hr, Hx-R + sample	4	3.84 ± 0.74 ^{c)}
sample	4	11.40 ± 2.13

* Hx-R: administered by intraperitoneal injection 10 mg per 100 g of rat body weight.

** Sample: oral administration of a commercially available alcohol drink (contg. 43% alcohol).

^{a)} mean ± standard error, significantly different ($p < 0.05$) from sample group.

^{b)} mean ± standard error, significantly different ($p < 0.1$) from sample group.

^{c)} mean ± standard error, significantly different ($p < 0.01$) from sample group.

差が認められた。

2. Hx-R 投与が市販酒精飲料を経口投与した白ネズミ血中アルコール濃度におよぼす影響

上記 *in vitro* および *in vivo* の実験結果から、Hx-R 添加により ADHase 活性の増加が認められたので、白ネズミに市販酒精飲料を経口投与したのち、Hx-R 投与群と無投与群との間で血中アルコール濃度に差異が認められるか否かについて実験を試みた。すなわち酒精飲料のみ投与したものを対照群、酒精飲料と Hx-R を投与したものを試験群として、それぞれ 2.5 hr, 4.5 hr, 6.0 hr 後に両群の血中アルコール濃度を比較検討した。

この結果 Table 6 に示すごとく、2.5 hr 経過で $|t| 2.541 > t_{0.05} = 2.447$, 4.5 hr 経過 $|t| 1.995 > t_{0.1} = 1.943$, 6.0 hr 経過で $|t| 7.483 > t_{0.01} = 3.707$ という数値が得られ、いずれの場合も Hx-R 投与群の血中アルコール濃度は、無投与群に比較して低い結果が得られ

た。

考 察

哺乳動物肝臓におけるアルコール代謝は、ADHase によるアセトアルデヒドの酸化、ついで ALDHase による酢酸への代謝過程が主要経路と考えられている。

江指らは Hx-R 添加が白ネズミ肝臓アルコール酸化能を増加することを報告しているが、著者らの実験からもこれを示唆する結果が得られた。すなわち白ネズミ、牛、豚肝臓ホモジネートならびに部分的に精製した酵素を用いての *in vitro* の実験では、エタノールを基質とした ADHase に対する活性増加が認められ、アセトアルデヒドを基質とした ALDHase への影響は顕著に認められなかった。同様に *in vivo* における実験からも Hx-R 投与による ADHase 活性の増加が認められた。これらの知見から生体内のアルコール酸化能に対し、

Hx-R 添加がなんらかの形で影響をおよぼすものと推察される。しかし、今回の実験で ADHase, ALDHase 活性はワールブルグ検圧計による酸素吸収のみで測定しているので ^{14}C -EtOH を用いて酵素反応の確認を行ない、さらに Hx-R との関連を追究するためには、精製された ADHase, ALDHase による実験が必要と考える。また動物肝臓におけるアルコール代謝については、ADHase のほかに C.S. Lieber¹⁴⁾ らによって肝臓ミクロゾームに NADPH 依存の ethanol oxidizing system (MEOS) の存在が報告されており、アルコール高濃度ではその代謝の 80% くらいが MEOS によることが報告¹⁵⁾ されている。さらに *in vitro* においては、アルコール代謝に catalase [E.C. 1.11.1.6.] も関与することが知られている。

一方、L. Marjanen¹⁶⁾ は白ネズミ肝臓における ALDHase 活性について検討し、ミトコンドリア、シトプラズマ画分にその活性が強いことを報告している。以上の諸研究を考慮し、今後白ネズミ肝臓ホモジネート画分について Hx-R 投与による影響を詳しく検討する必要があると考える。

さらに白ネズミ血中アルコール濃度と Hx-R 腹腔注射による ADHase 活性との関連性については、白ネズミ消化器官におけるエタノールの吸収の問題、尿中排泄の問題等さらに検討すべきものと考ええる。よって、今後 ADHase に対する Hx-R の作用機作の解明と、Hx-R 以外のプリン核酸関連化合物投与の影響についても深く追究してゆきたい。

要 約

各種哺乳動物の肝臓アルコール酸化酵素系の ADHase, ALDHase 活性に対し Hx-R 添加の影響を検討した結果、

1. 白ネズミ、牛、豚肝臓ホモジネートを用いた実験では、エタノールを基質とした ADHase 活性に対して Hx-R 添加が活性増加を示す所見が得られた。アセトアルデヒドを基質とした ALDHase 活性に対しては、顕

著な影響は認められなかった。

2. 牛肝臓および豚肝臓の部分的に精製した ADHase および ALDHase を用い Hx-R 添加効果を調べたところ、肝臓ホモジネートを用いた場合と同様に、ADHase 活性は増加したが、ALDHase 活性への影響は認められなかった。

3. 白ネズミに Hx-R を腹腔注射しその影響を検討したところ、2.5 hr 経過後すでに ADHase 活性の増加が認められ、また投与量の検討では Hx-R 5 mg/rat の投与で、ADHase 活性増加の傾向が認められた。

4. 白ネズミに市販酒精飲料を経口投与、同時に Hx-R を腹腔注射し、白ネズミ血中アルコール濃度を測定したところ、Hx-R 投与群の血中アルコール濃度が対照群に比較して低下する傾向が得られた。

文 献

- 1) 前川昭男：栄養と食糧，14，20 (1961)
- 2) Maekawa, A. *et al.* : *J. Vitaminology*, 7, 271 (1961)
- 3) Maekawa, A. *et al.* : *J. Vitaminology*, 8, 172 (1962)
- 4) Maekawa, A. *et al.* : *J. Vitaminology*, 9, 149 (1963)
- 5) 藤岡富士夫：農大農学集報，8，84 (1962)
- 6) Sugawara, T. *et al.* : *J. Vitaminology*, 11, 271 (1965)
- 7) 一寸木宗一：発酵と代謝，19，18 (1969)
- 8) 一寸木宗一：栄養と食糧，27，437 (1974)
- 9) 江指隆年：日本農芸化学会41年大会要旨 (1966)
- 10) 森村茂樹：精神神経学雑誌，57，131 (1955)
- 11) Bonnichsen, R.K. *et al.* : *Arch. Biochem.*, 18, 361 (1948)
- 12) Gordon, Subrahmanyam and Green : *Bioch. J.*, 764, 34 (1940)
- 13) Subrahmanyam, Green and Gordon : *Nature*, 1016, 144 (1939)
- 14) Lieber, C.S. and De Carli, L.M. : *Science*, N.Y. 162, 917 (1968)
- 15) Thieden, H.I.D. : *Acta. Chem. Scand.*, 25, 3421 (1971)
- 16) Marjanen, L. : *Biochem. J.*, 127, 633 (1972)

(昭和50年4月17日受理)